除虫菊 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因启动子克隆及功能分析

周黎[1]，李伽文[1]，徐郅卓[1]，曾拓[2]，王彩云[1*]

（1. 华中农业大学园艺植物生物学教育部重点实验室， 武汉 430070；2. 贵州师范大学 生命科学学院，贵阳 550001）

摘要：天然除虫菊酯是从除虫菊（*Tanacetum cinerariifolium*）中提取的绿色植物源生物杀虫剂。醛脱氢酶（TcALDH）和 GDSL 脂肪酶（TcGLIP）是除虫菊酯生物合成途径中的关键限速酶。为探究 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因的功能，该研究从除虫菊无性系‘W99’中克隆得到 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因的启动子，通过生物信息学分析、组织化学染色（GUS 染色）、荧光素酶报告实验和外源植物激素处理实验，对其启动子的调控元件、启动子活性、激素诱导特异性和组织特异性进行了分析。结果表明：（1）克隆得到的 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 启动子序列分别为 2 848、1 343 bp，均含有多个与逆境应答和激素信号相关的顺式作用元件。（2）分别构建了启动子和荧光素酶融合的植物表达载体，在烟草叶片中观察荧光成像发现，*TcALDH* 启动子具有茉莉酸甲酯（MeJA）和脱落酸（ABA）激素诱导特异性。（3）用 MeJA 和 ABA 处理除虫菊‘W99’组培苗发现，*TcALDH* 的表达量在 12 h 内受 ABA 诱导上调，受 MeJA 诱导时先升高后降低，*TcGLIP* 的表达量受 ABA 和 MeJA 诱导下调。（4）分别构建了 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 启动子与 *GUS* 基因融合的植物表达载体，转化烟草并对其转基因叶片进行 GUS 活性染色发现，*TcALDH* 启动子在烟草叶片腺体、腺毛头部及叶肉中表达，而 *TcGLIP* 启动子仅在烟草叶肉细胞中表达。综上认为，*TcALDH* 和 *TcGLIP* 的启动子具有组织特异性，*TcALDH* 启动子具有茉莉酸甲酯和脱落酸激素诱导特性。该研究为除虫菊 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因参与除虫菊酯合成的调控机制提供了新见解。

关键词：除虫菊，醛脱氢酶（TcALDH），GDSL 脂肪酶（TcGLIP），启动子，功能分析

中图分类号：Q943　　　　**文献标识码：**A

Cloning and functional analysis of promoter of *TcALDH* and *TcGLIP* genes related to pyrethrin synthesis

ZHOU Li[1], LI Jiawen[1], XU Zhizhuo[1], ZENG Tuo[2], WANG Caiyun[1*]

（1. *Key Laboratory of Horticultural Plant Biology*(*HZAU*), *MOE*, Wuhan 430070, China; 2. *School of Life Sciences*, *Guizhou Normal University*, Guiyang 550001, China）

Abstract: Natural pyrethrin is a green botanical insecticide that extracted from the aboveground tissues of pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*). Aldehyde dehydrogenase (TcALDH) and GDSL lipase (TcGLIP) are key rate-limiting enzymes involved in pyrethrin biosynthesis pathway in pyrethrum. The promoters of *TcALDH* and *TcGLIP* genes were cloned from the genomic DNA of pyrethrum clone ‘W99’ in order to investigate the regulatory mechanism of these genes. The two promoters were then used to drive the luciferase and *GUS* reporters in *Nicotiana benthamiana*

基金项目：国家重点研发项目（2019YFD1001500）； 中央高校基础研究基金项目（2662019FW016）；国家自然科学基金（32160718）[Supported by National Key Research and Development Project (2019YFD1001500); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2662019FW016); National Natural Science Foundation of China (32160718)]。

第一作者：周黎(1998 -)，硕士，研究方向为观赏植物生理与调控，（E-mail）zhouli@mail.hzau.edu.cn。

***通信作者：**王彩云，博士，教授，研究方向为花卉生理与品质及其花卉应用，（E-mail）wangcy@mail.hzau.edu.cn。

respectively, to figure out its regulatory elements, activity, hormone specificity and tissue inducibility. The results were as follows： (1) Using pyrethrum genomic DNA as a template, specific primers were used to clone the *pTcALDH* and *pTcGLIP* fragments. The sequence lengths of *pTcALDH* and *pTcGLIP* were 2 848 and 1 343 bp, respectively, and the promoter analysis software the PlantCARE predicted that they both contained multiple *cis*-elements related to stress response and hormone signals. (2) The plant expression vectors fused by *pTcALDH* and *pTcGLIP* and luciferase report gene were constructed, and were transformed into *N. benthamiana* to analyse hormone inducibility by observing the fluorescence imaging in tobacco leaves. The results demonstrated that the *pTcALDH* displayed typical hormone inducibility of methyl jasmonate (MeJA) and abscisic acid (ABA), whereas the *pTcGLIP* showed no response. (3) The tissue culture seedlings of pyrethrum 'W99' were treated with MeJA and ABA, the expression of *TcALDH* was up-regulated by ABA within 12 h, and first increased and then decreased under MeJA treatment; the expression of *TcGLIP* was down-regulated by ABA and MeJA. (4) We constructed the expression vectors of *pTcALDH* and *pTcGLIP* fused with *GUS* reporters and transformed them into *N. benthamiana*, then the transient transformation of tobacco drived the expression of *GUS* gene and showed initiating activity. It was found that the *pTcALDH* expressed in both the glands, glandular hair heads and mesophyll of the leaves, while the *pTcGLIP* was only expressed in the parenchyma cell. These results indicated that the *pTcALDH* and *pTcGLIP* were tissue-specific promoters, and the *pTcALDH* appeared MeJA-inducible and ABA-inducible characteristics. This study provides a new insight into the regulatory mechanism of *TcALDH* and *TcGLIP* genes involved in pyrethrin synthesis.
Key words: *Tanacetum cinerariifolium*, TcALDH, TcGLIP, promoter, functional analysis

除虫菊（*Tanacetum cinerariifolium*）作为一种多年生菊科植物，几个世纪以来一直被用于提取绿色植物源杀虫剂除虫菊酯(Lybrand et al., 2020)。因其提取于花头的除虫菊酯具有杀虫迅速、无富集易降解，对哺乳动物毒性小、适用于敏感人群等特性，被广泛应用于有机农业和家居防治(Nelson, 1974)，其花头还能够释放大量挥发性萜烯(*E*)-beta-法尼烯[(*E*)-beta-farnesene, EβF）]，能够在田间吸引瓢虫驱避蚜虫(Li et al., 2019; Li et al., 2021)，同时吸引大量授粉昆虫如食蚜蝇等(Zeng et al., 2021; 曾拓等，2021)。因此，除虫菊也作为一种间作作物，在我国云南有广泛的应用(周黎等，2022)。全世界对除虫菊酯的需求较大，将其作为天然植物源杀虫剂以避免过度使用化学合成杀虫剂(Suraweera et al., 2017)。如何提高除虫菊酯的含量一直是除虫菊产业和基础研究的热点和重点。

除虫菊酯在植物体内由单萜羧基部分（菊酸和除虫菊酸）和酮醇部分（除虫菊酮醇、茉莉酮醇和瓜叶酮醇）酯化形成(Staudinger & Ruzicka 1924; Mossa et al., 2018)。酸前体来源于萜烯途径的质体甲基赤藓醇-4 磷酸（methylerythritol 4-phosphate, MEP）途径(Lybrand et al., 2020)，酮醇前体来源于茉莉酸类激素（jasmonates, JAas）途径(Matsuda et al., 2005)。在除虫菊酯单萜合成模型中，两分子二甲基烯丙基二磷酸（dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP）首先在腺体中依次由菊基二磷酸合成酶（chrysanthemyl diphosphate synthase, CDS）、乙醇脱氢酶 2（alcohol dehydrogenase2, ADH2）、醛脱氢酶 1（aldehyde dehydrogenase1, ALDH1）催化形成前体分子菊酸，随后菊酸被运输到腺体下方的皮下组织，最终在种子果皮中被 GDSL 脂肪酶（GDSL lipase protein, GLIP）催化形成除虫菊酯，后被胚胎吸收转移至幼苗组织中(Kikuta et al., 2012; Ramirez et al., 2012; Xu et al., 2018; Lybrand et al., 2020; Li et al., 2022a)。TcALDH 参与除虫菊酸部分最后一步催化反应合成菊酸 CoA，菊酸 CoA 和酮醇则在 TcGLIP 的催化作用下通过酯键相连合成最终产物除虫菊酯(Kikuta et al., 2012; Wang et al.,

2022)。由此可知， *TcALDH* 和 *TcGLIP* 是除虫菊酯合成的关键限速酶基因。目前，已经从拟南芥和棉花中克隆到大量 *ALDH* 和 *GLIP* 基因的启动子(Hou & Bartels, 2015; Guo et al., 2017; Ma et al., 2018; Yang et al., 2021)，此外高粱、大豆以及黄花蒿等物种中也报道了 *ALDH* 基因的启动子。然而从除虫菊仅中分离出了一个具有腺体特异表达的菊基二磷酸合成酶基因 *TcCHS* 的启动子(Sultana et al., 2015)。因此，研究其他除虫菊酯合成酶基因的启动子是解析除虫菊酯合成调控机制的前提。

茉莉酸及其衍生物不仅作为反应底物参与除虫菊酯酮醇部分的生物合成，同时作为防御应激类激素调控除虫菊酯的合成(Matsuda et al., 2005; Li et al., 2018)。课题组前期进行了茉莉酸甲酯处理下的白花除虫菊叶片和花期转录组数据分析，注释到了很多与除虫菊酯合成代谢相关的基因。基于此，本研究通过除虫菊无性系‘W99’克隆得到了 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因的启动子序列，对其调控元件、启动子活性、激素诱导特异性和组织特异性进行了分析，进一步揭示除虫菊酯的合成机制及代谢调控中植物激素的作用，从而为培育除虫菊优良品种和提高除虫菊酯含量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

除虫菊无性系‘W99’的叶片取自华中农业大学组培室。大肠杆菌 DH5α 和根癌农杆菌 GV3101、EHA105 购自上海唯地生物技术有限公司。用于转化的本氏烟草（*Nicotiana benthamiana*）在 25 ℃、16 h 光照/8 h 黑暗条件的组培室中生长。

1.2 启动子克隆

利用 RaPure plant DNA mini kit（美基生物, 中国）提取除虫菊叶片的 gDNA 作为模板，依据除虫菊基因组(Yamashiro et al., 2019)，设计 *TcALDH* 基因启动子的特异引物 F-ALDH-pro 及 ORF 下游 R-ALDH-ORF（表 1），*TcGLIP* 基因启动子的特异引物 F-GLIP-pro 及 ORF 下游 R-GLIP-ORF（表 1），利用高保真酶 High-Fidelity Master Mix（MCLAB, China）进行扩增，将扩增产物连接到 pBLUE-T 载体（ZOMANBIO, China），转化大肠杆菌，挑选单菌落进行测序。利用除虫菊基因组对获得的片段进行检验。利用 PlantCARE 软件对启动子的元件进行预测。

1.3 载体构建

以测序正确的质粒为模板，分别利用含有同源重组片段的引物 Luc-aldh-F、Luc-aldh-R、Luc-glip-F、Luc-glip-R（表 1）进行扩增。回收 PCR 产物，连接到经 *Hind*III 酶切的 pGreenII 0800-LUC 载体上，转化大肠杆菌，挑选单菌落进行测序，选取测序正确的载体转化 GV3101 农杆菌。

以测序正确的质粒为模板，分别利用含有同源重组片段的引物 F-aldh121pro、R-aldh121pro、F-glip121pro、R-glip121pro（表 1）进行扩增。回收 PCR 产物，连接到经 *Hind*III 和 *BamH*I 酶切的 PBI121 载体上，转化大肠杆菌，挑选单菌落进行测序，选取测序正确的载体转化 EHA105 农杆菌。

1.4 烟草中 LUC 瞬时表达和荧光成像

将含有重组 pGreenII 0800-LUC 载体的农杆菌单菌落接种到 YEP 液体培养基中，培养至 OD600=0.5，5 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 7 min 后，用 MES 侵染液重悬，调节至 OD600=1.0。选取 2 至 3 周的本氏烟草，用无针头的注射器将农杆菌菌液注射到烟草叶片，叶片左半部分注射含空载 pGreenII 0800-LUC 载体的农杆菌，右半部分注射含有重组 pGreenII 0800-LUC 载体的农杆菌。注射后的烟草置于人工气候室中培养 2 d 后，在烟草叶片上喷施 50 $\mu mol\cdot L^{-1}$ 的脱落酸（abscisic acid, ABA），浓度参考胡慧敏等(2021)的方法，或喷施 100 $\mu mol\cdot L^{-1}$ 的茉莉酸甲酯（methyl jasmonate, MeJA），浓度参考陈雨倩等(2021)的方法，以喷施清水植株的叶片

作为对照。放置 12 h 后，将 Dual-Luciferase Reporter Assay 试剂盒中的 Luaferase Assay Substrate 与 Luaferase Assay Buffer II 混合，涂抹在烟草的注射区，然后使用 LB 985 Nightshade system（Berthold，Bad Wildbad，德国）仪器观察荧光。

1.5 不同激素处理下除虫菊 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因表达分析

MeJA 处理：继代培养一个月的除虫菊‘W99’无性系作为实验材料，使用 5 mL 的 2 mmol·L^{-1} 的 MeJA 溶液喷施处理组培苗，浓度参考(Buraphaka & Putalun, 2020)，拧紧瓶盖，培养 0、4、12 h 后，将实验材料叶片放置在液氮中迅速冷却后，保存于–80 ℃。

ABA 处理：继代培养一个月的除虫菊‘W99’无性系作为实验材料，使用 5 mL 的 1 mmol·L^{-1} 的 ABA 溶液喷施处理组培苗，浓度参考，拧紧瓶盖，培养 0、4、12 h 后，将实验材料叶片放置在液氮中迅速冷却后，保存于–80 ℃。

利用 Real-time qPCR 分析两种激素处理后的基因表达水平。RNA 提取使用植物 RNA 提取试剂盒 Ultrapure RNA Kit（CWBIO 康为世纪生物科技有限公司），反转录形成 cDNA 使用 EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix（TRAN 北京全式金生物技术有限公司），荧光定量的仪器为 Applied Biosystems 7500 platform，试剂为 2×Sybr Green qPCR Mix（Aidlab，北京艾德莱生物科技有限公司），荧光定量使用的引物为 TcALDH-RT-F、TcALDH-RT-R、TcGLIP-RT-F、TcGLIP-RT-R、TcGAPDH-F 和 TcGAPDH-R（表 1）(Ramirez et al., 2012)。

1.6 烟草遗传转化筛选及 GUS 表达

将含有 *pTcGLIP-GUS* 质粒的农杆菌单菌落接种到 YEP 液体培养基中，培养至 OD600=0.5，5000 r·min^{-1} 离心 7 min 后，用液体 MS 重悬，调节至 OD600=0.5。将烟草叶片切成 0.5 cm×0.5 cm，放入农杆菌菌液，侵染 10 min 后，在滤纸上晾干，放入烟草共培养培养基，培养基配方为 MS 基本培养基（Murashige & Skoog basic medium, MS）+2.25 mg·L^{-1}6-苄氨基嘌呤（6-Benzyladenine, 6-BA）+0.3 mg·L^{-1}1-萘乙酸（1-Naphthylacetic acid, NAA），黑暗条件下培养 2 d 后，将叶片转移至筛选培养基，培养基配方为 MS+2.25 mg·L^{-1} 6-BA+0.3 mg·L^{-1} NAA+400 mg·L^{-1} 头孢霉素（cefotaxime, Cef）+50 mg·L^{-1} 卡那霉素（kanamycin, Kan），每 2 周继代一次，当抗性芽生长至 1 cm 时，将抗性芽切下，放置在含有 400 mg·L^{-1} Cef 和 50 mg·L^{-1} Kan 的 MS 培养基中，继续培养。

提取卡纳霉素抗性本氏烟草叶片的 DNA，以其为模板，用 F-aldh121pro 作为上游，*TcALDH* 启动子特异引物 R-aldh-pro280 作为下游，检验 *pTcALDH-GUS* 转基因烟草；用 F-glip121pro 作为上游，R-GUS-T 作为下游，检验 *pTcGLIP-GUS* 转基因烟草，转化所用菌株为阳性对照，野生烟草为阴性对照。植物 DNA 提取试剂盒为 HiPure Plant DNA Mini Kit（美基生物，中国），PCR 扩增 mix 为 2×Taq Master Mix（近岸蛋白质科技有限公司，中国）。

将继代培养一个月的阳性烟草用 GUS Staining Kit（Coolaber, 中国）进行染色，实验步骤参照试剂盒说明书，染色后用 70%的酒精脱色至叶片完全褪绿后，在体视显微镜下观察染色情况。每个启动子均取 3 个独立的转基因株系进行染色。

表 1 实验所用引物

Table 1 Primers used in the experiments

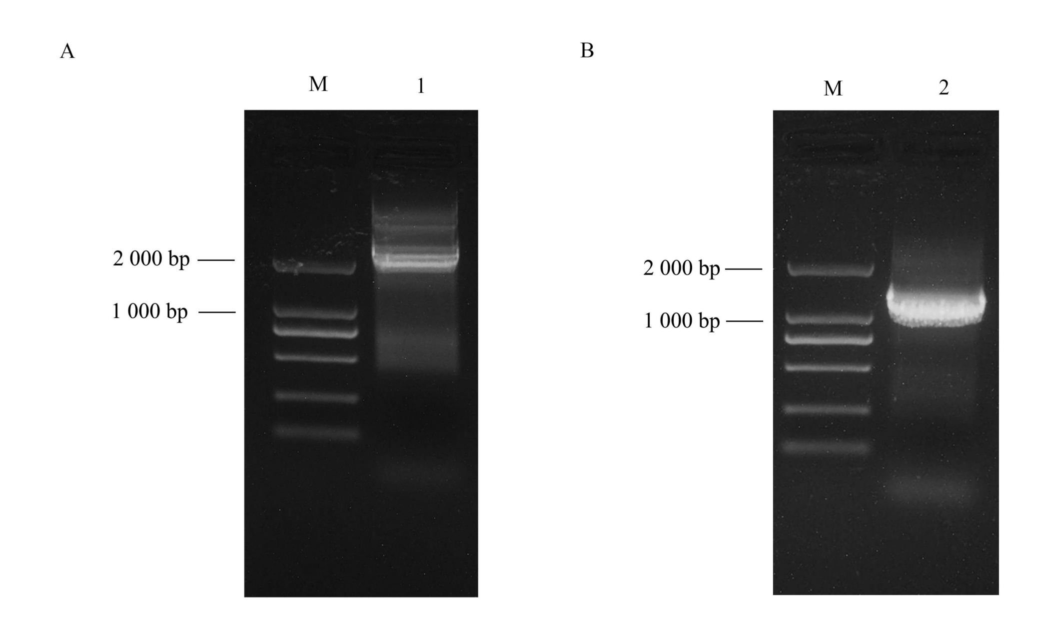
引物 Primer	序列 5′ 到 3′（从左到右） Sequences from 5′ to 3′ (from left to right)
F-GLIP-pro	AAACTAGAAGCAAAGATCATCGTACT
R-GLIP-ORF	TTAACATGGGTGTTGATGTGGT
F-ALDH-pro	CCCCTCTATAGAAAGATAATTTAATTC
R-ALDH–ORF	GAACTTGATGTCATAAGCTAA
F-glip121pro	GACCATGATTACGCCAAGCTTGAAAAACTAGAAGCAAAGATCATCGT

R-glip121pro	GGACTGACCACCCGGGGATCCAGCTTATATGTGCTCAGACAAGAGGT
F-aldh121pro	GACCATGATTACGCCAAGCTTCCCCTCTATAGAAAGATAATTTAATTCTTG
R-aldh121pro	GGACTGACCACCCGGGGATCCTTTTCTCCTCTCTCTCTTTTTTTAATT
R-GUS-T	TGGCCTGCCCAACCTTTCG
R-aldh-pro280	GGCGACGGTAGGAACTCAA
F-npt ii-orf	ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC
R-npt ii-orf	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG
F-Reverse-npt ii	TCCTGTCAAACACTGATAG
R-Reverse-npt ii	AGGATATATTGGCGGGTAAACC
TcALDH-RT-F	CATTCCGCTACTTTGCTGGTGC
TcALDH-RT-R	TCCAAGGAATGATGTGTCCAACTAC
TcGLIP-RT-F	GCCGGGAATGCGAGCAAAACAAC
TcGLIP-RT-R	CGCTCTCGCCTTCCTTAAAACCATA
TcGAPDH-F	AAGGAGGAATCTGAAGGAAAGCTG
TcGAPDH-R	GTTGTTGTTCAAAGCGATTCCAGC

2 结果与分析

2.1 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 启动子克隆

以提取的除虫菊基因组 DNA 为模板，使用特异性引物 F-ALDH-pro 和 R-ALDH-ORF 克隆得到 *TcALDH* 基因 ATG 上游 2 848 bp 的启动子序列，使用特异性引物 F-GLIP-pro 和 R-GLIP-ORF 扩增 *TcGLIP* 启动子，获得条带大小为 1 343 bp（图 1）。分别命名为 *pTcALDH* 和 *pTcGLIP*。



M. DL 2 000 marker；**1**. *pTcALDH* 片段；**2**. *pTcGLIP* 片段。

M. DL 2 000 marker; **1**. Fragments of *pTcALDH*; **2**. Fragments of *pTcGLIP*.

图 1 *pTcALDH*(**A**)和 *pTcGLIP*(**B**)PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of *pTcALDH* (**A**) and *pTcGLIP* (**B**)

2.2 *pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 调控元件分析

利用 PlantCARE 软件分析了 *pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 的顺式作用元件。结果显示在 *pTcALDH* 序列 2 848 bp 的区域共检测到 43 种 210 个作用元件，在 *pTcGLIP* 序列 1 343 bp 的区域检测到 30 种 116 个作用元件。*pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 均含有多个核心启动子元件（TATA-box）和增强子元件（CAAT-box）等基本特征元件，此外还包含许多与激素响应（茉莉酸甲酯、水杨酸、生长素、脱落酸、赤霉素等）、胁迫响应（损伤、低温、干旱等）和光响应相关的元件（表 2、表 3）。这两个基因启动子序列均含有茉莉酸甲酯响应元件（TGACG-motif 和 CGTCA-motif）和 ABA 响应元件（ABRE）。

表 2　*pTcALDH* 部分顺式作用元件

Table 2 Part of *cis*-acting regulatory elements of *pTcALDH*

类别 Class	名称 Name	核心序列 Core sequence	数量 Number	预测功能 Predictive function
转录调控 Transcriptional regulation	TATA-box	TATA	26	核心启动子元件 Core promoter element around -30 of transcription start
	CAAT-box	CAAT	38	启动子和增强子区的共顺式作用元件 Common *cis*-acting element in promoter and enhancer regions
激素响应 Hormone response	TGA-element	AACGAC	3	生长素响应元件 Auxin-responsive element
	TGACG-motif	TGACG	3	参与茉莉酸甲酯响应的顺式作用元件 *cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
	CGTCA-motif	CGTCA	3	
	ABRE	GCAACGTGTC	1	参与脱落酸响应的顺式作用元件 *cis*-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
	MYCATRD22	CACATG	1	
	ABRE	ACGTG	3	
	TATC-box	TATCCCA	2	参与赤霉素响应的顺式作用元件 *cis*-acting element involved in gibberellin-responsiveness
	TCA-element	CCATCTTTTT	1	参与水杨酸响应的顺式作用元件 *cis*-acting element involved in salicylic acid responsiveness
胁迫响应 Stress response	MBS	CAACTG	2	MYB 结合位点参与干旱诱导 MYB binding site involved in drought-inducibility
	W-box	TTGACC	2	创伤响应 Trauma response
	LTR	CCGAAA	1	参与低温反应的顺式作用元件 *cis*-acting element involved in low-temperature responsiveness
	TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	1	参与防御和应激反应的顺式作用元件 *cis*-acting element involved in defense and stress responsiveness
	ARE	AAACCA	4	无氧诱导所需的顺式作用元件 *cis*-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
光响应 Light response	AE-box	AGAAACA/TA/T	2	光响应模块的一部分 Part of a module for light response
	Box 4	ATTAAT	1	光响应的部分保守 DNA 模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
	chs-CMA1a	TTACTTAA	1	部分光响应元件

chs-CMA2a	TCACTTGA	1	Part of a light responsive element
GATA-motif	GATAGGA	1	
Box II	TGGTAATAA	1	
I-box	atGATAAGGTC	1	
GA-motif	ATAGATAA	1	
GT1-motif	GGTTAAT	2	光响应元件 Light responsive element
G-Box	CACGTT	1	光响应的顺式作用元件
G-box	CACGAC	3	*cis*-acting regulatory element involved in light responsiveness

表 3　*pTcGLIP* 部分顺式作用元件

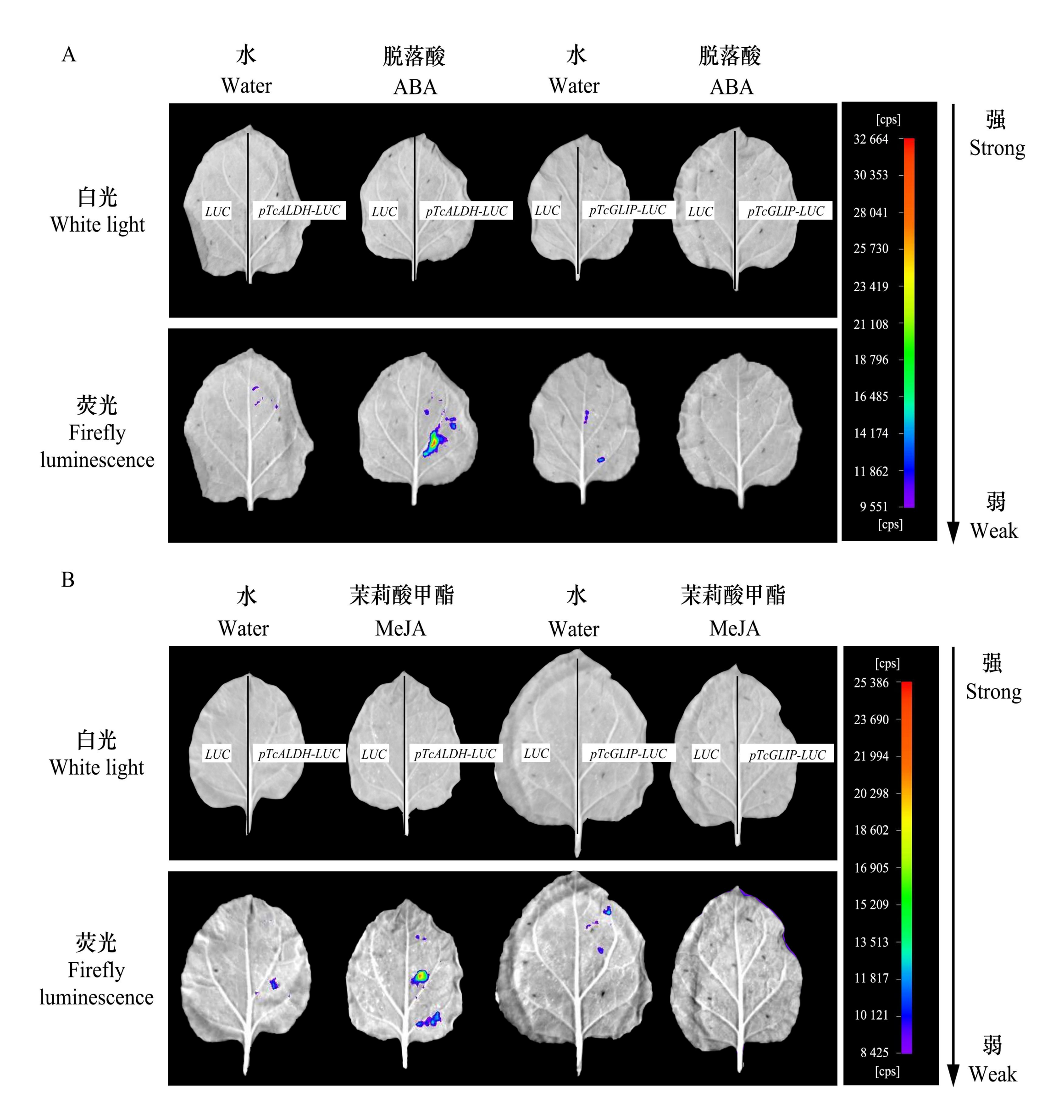
Table 3 Part of *cis*-acting regulatory elements of *pTcGLIP*

类别 Class	名称 Name	核心序列 Core sequence	数量 Num	预测功能 Predictive function
转录调控 Transcriptional regulation	TATA-box	TATA	9	核心启动子元件 Core promoter element around -30 of transcription start
	CAAT-box	CAAT	19	启动子和增强子区的共顺式作用元件 Common *cis*-acting element in promoter and enhancer regions
激素响应 Hormone response	CGTCA-motif	CGTCA	1	参与茉莉酸甲酯响应的顺式作用元件
	TGACG-motif	TGACG	1	*cis*-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
	ABRE	GCCGCGTGGC	2	参与脱落酸响应的顺式作用元件
	MYCATRD22	CACATG	2	*cis*-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
胁迫响应 Stress response	W-box	TTGACC	5	创伤响应 Trauma response
	LTR	CCGAAA	1	参与低温反应的顺式作用元件 *cis*-acting element involved in low-temperature responsiveness
	TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	2	参与防御和应激反应的顺式作用元件 *cis*-acting element involved in defense and stress responsiveness
	MBS	CAACTG	2	MYB 结合位点参与干旱诱导 MYB binding site involved in drought-inducibility
光响应 Light response	I-box	gGATAAGGTG	1	光响应模块的一部分 Part of a module for light response
	G-box	TACGTG	1	光响应的顺式作用元件 *cis*-acting regulatory element involved in light responsiveness
	Sp1	GGGCGG	1	光响应元件
	GT1-motif	GGTTAA	1	Light responsive element

2.3 *pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 活性和激素诱导特性分析

将含有 *pTcALDH-LUC* 和 *pTcGLIP-LUC* 表达载体的农杆菌分别注射烟草叶片，荧光成像结果显示，含有 *pTcALDH-LUC* 和 *pTcGLIP-LUC* 载体的农杆菌注射部位，荧光强度高于空载对照，说明 *pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 能够驱动 *LUC* 基因的表达，具有启动子活性。注射含有 *pTcALDH-LUC* 表达载体农杆菌的叶片在 ABA 和 MeJA 激素处理后，荧光强度显著高于清水对照，表明 *pTcALDH* 具有 ABA 和 MeJA 激素诱导特性（图 2）。而注射含有

pTcGLIP-LUC 表达载体农杆菌的叶片在 ABA 和 MeJA 激素处理后，荧光强度低于清水对照（图 2）。



A. 1 mmol·L^{-1} ABA 处理；**B**. 2 mmol·L^{-1} MeJA 处理。

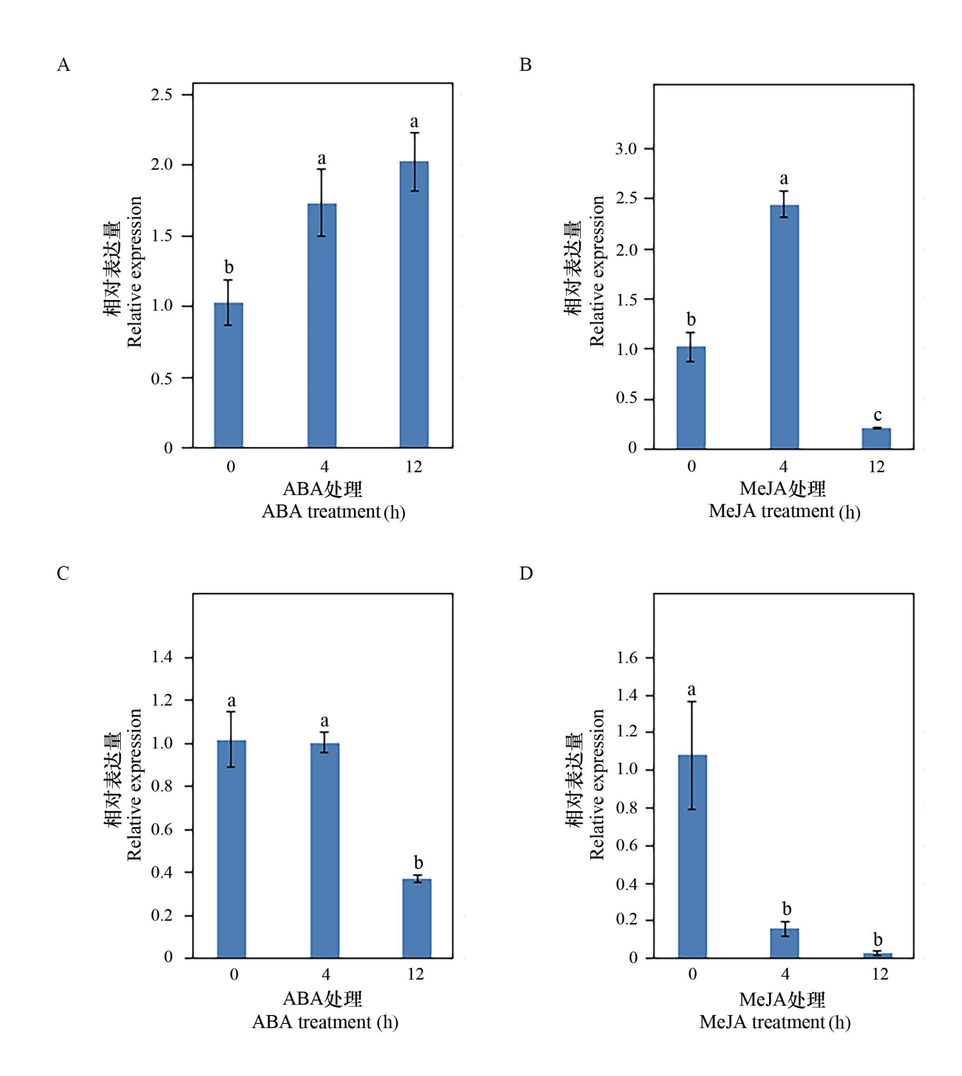
A. 1 mmol·L^{-1} ABA treatment; **B**. 2 mmol·L^{-1} MeJA treatment.

图 2 不同激素处理下 *pTcALDH-LUC* 和 *pTcGLIP-LUC* 转基因烟草荧光成像结果

Fig.2 Firefly luminescence imaging of *pTcALDH-LUC* and *pTcGLIP-LUC* in transgenic tobacco under different hormone treatments

2.4 不同激素处理下除虫菊叶片 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因表达分析

用 ABA 和 MeJA 处理除虫菊组培苗，检测 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因转录水平。结果表明，MeJA 和 ABA 处理可显著影响除虫菊 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因的表达，其中 *TcALDH* 的表达受 ABA 诱导上调，受 MeJA 诱导表达量先升高后降低；*TcGLIP* 的表达受 ABA 和 MeJA 诱导下调（图 3）。



A. ABA 处理下 *TcALDH* 基因的表达分析; **B**. MeJA 处理下 *TcALDH* 基因的表达分析; **C**. ABA 处理下 *TcGLIP* 基因的表达分析; **D**. MeJA 处理下 *TcGLIP* 基因的表达分析。不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。

A. Expression analysis of *TcALDH* under ABA treatments; **B**. Expression analysis of *TcALDH* under MeJA treatments; **C**. Expression analysis of *TcGLIP* under ABA treatments; **D**. Expression analysis of *TcGLIP* under MeJA treatments. Different letters indicate significant differences($P<0.05$).

图 3　不同处理下除虫菊叶片 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因表达分析

Fig. 3 Expression analysis of *TcALDH* and *TcGLIP* in *Tanacetum cinerariifolium* leaves under different treatments

2.5 *pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 组织特异性分析

将 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 启动子区域与 *GUS* 报告基因融合，转化烟草，获得了 4 个独立的 *pTcALDH-GUS* 转基因株系和 5 个独立的 *pTcALDH-GUS* 转基因株系。对这些转基因株系进行 GUS 染色，结果表明，在野生型植物中无任何组织观察到蓝色，在 *pTcALDH-GUS* 转基因烟草叶的腺毛头部显现出明显蓝色，而在 *pTcALDH-GUS* 转基因烟草叶中没有发现明显的组织特异染色（图 4）。

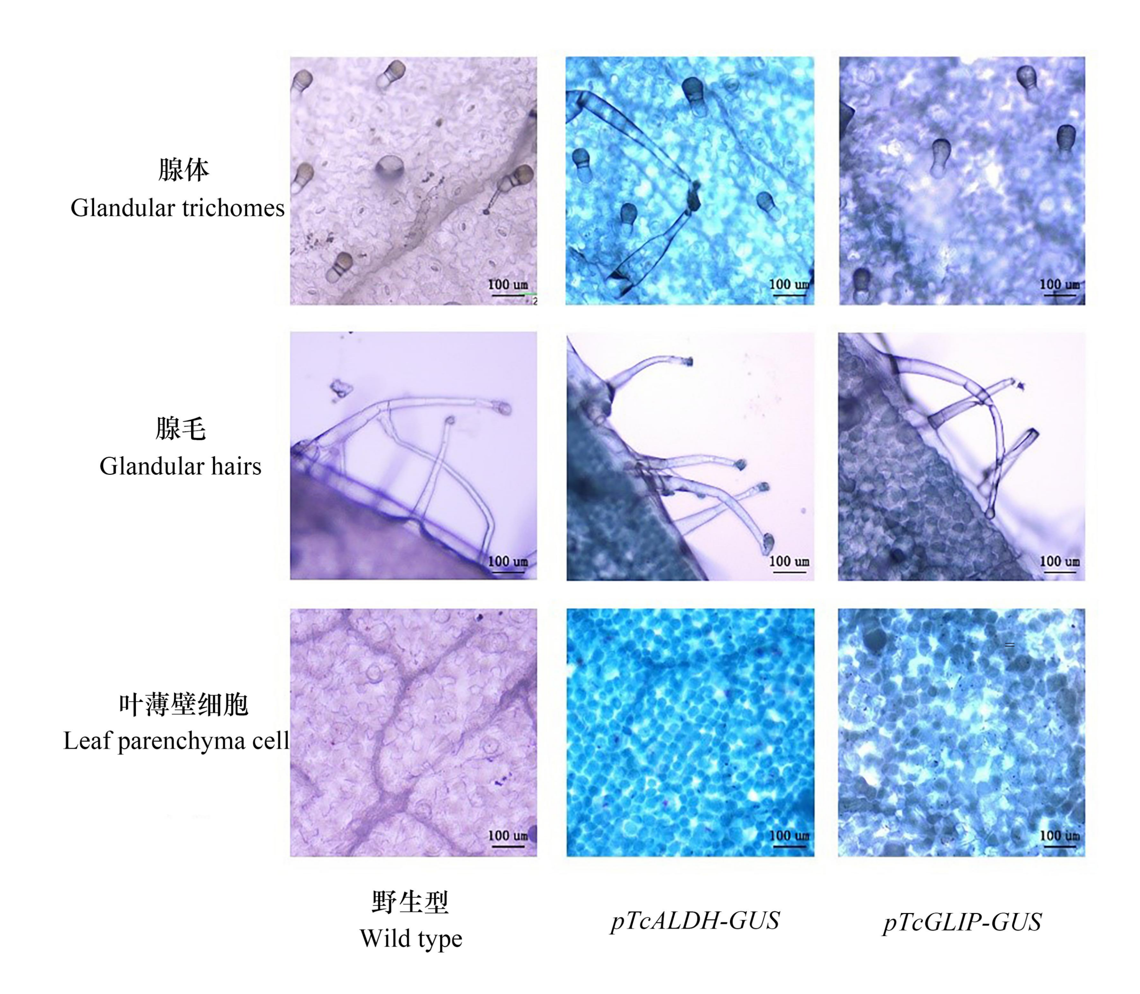


图 4 转基因烟草和野生型烟草 GUS 染色

Fig. 4 GUS staining of transgenic and wild-type *Nicotiana benthamiana*

3 讨论与结论

本研究利用除虫菊基因组及 PCR 测序验证，获得了 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 的启动子序列。*pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 序列均含有多个核心启动子元件(TATA-box)和增强子元件(CAAT-box)等基本特征元件，表明这两个基因的启动子拥有典型启动子的功能。除此之外，*pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 区域还包含了激素响应、胁迫响应和光响应元件。启动子序列分析表明，*pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 均含有参与 MeJA 响应的 CGTCA 基序和 ABA 响应基序，这恰好解释了 MeJA 可以促进除虫菊酯的合成。类似地，在 *pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 中均发现了 MBS 元件，它是参与干旱诱导的 MYB 的结合位点，而有趣的是，之前有研究表明除虫菊酯的产量受干旱的影响(Suraweera et al., 2017)。除了除虫菊中 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因会响应机械损伤使得除虫菊酯含量上升外(Kikuta et al., 2012)，黄花蒿中 *AaALDH* 基因也会因为伤害处理上调(王焕燕，2016)，这可能与损伤响应元件 W-box 相关。综上可知，*pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 序列包含 MYB、MYC、BZIP、WRKY 等转录因子可结合的元件，如 MBS、RBRE、G-box、W-box 等(Yang et al., 2020; Fu et al., 2021)，因此推测这两个基因的表达可能受这些转录因子的调控。最新的研究发现证实了白花除虫菊中 *TcMYC2* 和 *TcMYB8* 均可以通过上调 *TcGLIP* 基因表达进而提高叶片中除虫菊酯的含量(Zhou et al., 2022; Zeng et al., 2022)。

植物次生代谢物质合成受茉莉酸、脱落酸、水杨酸等植物激素的调控(Lv et al., 2017)。

TcALDH 作为除虫菊酯合成关键基因，其启动子具有 ABA 和 MeJA 激素诱导特性。*TcALDH* 的基因表达量在 ABA 处理后上调，在 MeJA 诱导下先显著上升后下降。这与前人的研究结果基本一致，除虫菊中 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因的表达受 MeJA 的影响(Li et al., 2018)，进一步证明茉莉酸甲酯可以调控除虫菊酯合成。在除虫菊的近缘种黄花蒿中，用 MeJA 处理黄花蒿，*AaALDH*1 基因表达量也有显著的提高(王焕燕，2016)。这说明 MeJA 也会调控青蒿素的合成。与 *TcALDH* 处理结果相反的是，*TcGLIP* 启动子不具备 MeJA 和 ABA 诱导特异性，且处理后基因表达量显著下降。这与前人研究报道的拟南芥 *NtGLIP1* 不受茉莉酸调控结果基本一致，*NtGLIP*1 仅为水杨酸（Salicylic acid, SA）响应分泌蛋白(Oh et al., 2005)。而 *NtGLIP*2 可以响应 JA，并通过响应生长素抵御生物胁迫(Lee et al., 2009)。拟南芥、棉花和除虫菊的 *ALDH* 基因启动子均能响应 ABA，除此之外，除虫菊 *pTcALDH* 可以响应 MeJA；而拟南芥和棉花 *GLIP* 基因启动子均可响应乙烯（ethylene, ET），且拟南芥 *NtGLIP* 基因启动子具有生长素诱导特性，这在除虫菊中未见报道(Kirch et al., 2005; Hou & Bartels, 2015; Guo et al., 2017；胡阳光，2019)。这说明参与代谢合成的基因通常具有各自的激素诱导特异性，通过响应以一种或者多种植物激素调控次生代谢物质合成，在植物生物或非生物胁迫中发挥作用。

大量研究表明，MeJA 能够促进次生代谢物在植物体内的积累(Wasternack et al., 2019)。MeJA 短效处理可以促进除虫菊酯合成基因的瞬时上调，但不能维持较高的除虫菊酯含量；JA 路径部分合成酶基因和 *TcGLIP* 基因表达量反而下调(Zeng et al., 2022)。除虫菊酯前体物质主要在腺体中合成，被运输到细胞外形成最终产物，储存在花头的子房中（王凤姣等，2021）。花头中具有丰富的特殊结构，如分泌管/腔或胞外空间(Ramirez et al., 2012)。然而在叶片中并没有发现类似的结构或空间来储存除虫菊酯。除虫菊毛状根中也仅存在极低含量的除虫菊酯(Li et al., 2022b)。这意味着除虫菊酯的生物合成可能受到强大的负反馈，以避免除虫菊酯的过度积累。植物体内这种负反馈调节机制可能通过抑制 GLIP 酶的活性从而降低除虫菊酯的含量。

此外，GUS 组织染色结果表明，*TcALDH* 主要在腺体中表达，而 *TcGLIP* 仅在皮下薄壁细胞下表达。这些结果基本与前人的研究一致，既腺体中表达的 *TcALDH* 用以合成菊酸，薄壁细胞中表达 *TcGLIP* 用以合成除虫菊酯(Kikuta et al., 2012; Ramirez et al., 2012; Xu et al., 2018)。黄花蒿 *ALDH*1 基因在只在成熟的莲座叶的腺毛体中表达(王焕燕，2016)。然而，本实验的结果与前人的预测略有不同，本研究表明薄壁细胞也可能具有表达 *TcALDH* 的能力，*TcALDH* 基因并非为腺体特异表达。拟南芥中 NtGLIP1 和其他 NtGLIPs 信号定位同样在细胞壁或者胞外(Oh et al., 2005; Lee et al., 2009)。通过亚细胞定位研究拟南芥 *NtALDH* 和 *NtGLIP*，NtALDH 蛋白多分泌于质体和细胞质，NtGLIP 蛋白通常分布在细胞壁或胞外(Oh et al., 2005; Lee et al., 2009; Hou & Bartels, 2015)。当前报道仅分析了棉花 *GhALDH* 和 *GhGLIP* 基因组数据和启动子的元件，在空间表达上未见报道(Guo et al., 2017; Ma et al., 2018)。

本研究分析了 *pTcALDH* 和 *pTcGLIP* 的调控元件，启动子活性，激素诱导特异性和组织特异性。其中 *pTcALDH* 具有 MeJA 和 ABA 激素诱导特异性，且这两种激素影响除虫菊酯合成基因的表达水平。*TcALDH* 主要定位在腺体中，而 *TcGLIP* 主要定位在胞外，这再次验证了菊酸的合成部位在腺体而除虫菊酯的合成部位在胞外。本研究可为进一步探讨除虫菊中 *TcALDH* 和 *TcGLIP* 基因的表达调控机制提供理论参考依据。

参考文献：

BURAPHAKA H, PUTALUN W, 2020. Stimulation of health-promoting triterpenoids accumulation in *Centella asiatica* (L.) Urban leaves triggered by postharvest application of methyl jasmonate and salicylic acid elicitors [J]. Ind Crops Products, 146: 112171.

CHEN YQ, XU G, LINGHU QQ, 2021. Cloning and functional analysis of *Jatropha curcas*

JcGAST1 gene promoter [J]. Plant Physiol J, 57(11): 2145-2154. ［陈雨倩，徐刚，令狐前前，2021. 麻疯树 *JcGAST1* 基因启动子克隆及其功能初步分析 [J]. 植物生理学报，57(11): 2145-2154.］

FU XQ, PENG BW, HASSANI D, et al., 2021. *AaWRKY9* contributes to light- and jasmonate-mediated to regulate the biosynthesis of artemisinin in *Artemisia annua*[J]. New Phytol, 231(5): 1858-1874.

GUO XL, WANG YY, LU HJ, et al., 2017. Genome-wide characterization and expression analysis of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily under abiotic stresses in cotton [J]. Gene, 628: 230-245.

HOU QC, BARTELS D, 2015. Comparative study of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in the glycophyte *Arabidopsis thaliana* and *Eutrema halophytes* [J]. Ann Bot, 115(3): 465-479.

HU HM, CAI WH, MU KB, et al., 2021. Study on the heterologous expression of *GmCDPK SK5* gene in soybean ABA signaling pathway [J]. Soybean Sci, 40(6): 737-747.［胡慧敏，蔡婉菡，穆可彬，等，2021. 大豆 ABA 信号途径 *GmCDPK SK5* 基因异源表达探究 [J]. 大豆科学，40(6): 737-747.］

HU YG, 2019. Preliminary analiysis of *ALDH7* and *ALDH12* gene functions in cotton under salt and drought stress [D]. Kaifeng: Henan University. ［胡阳光，2019. 棉花 *ALDH7* 和 *ALDH12* 基因在盐和干旱胁迫下功能初步分析 [D]. 开封：河南大学.］

KIKUTA Y, UEDA H, TAKAHASHI M, et al., 2012. Identification and characterization of a GDSL lipase-like protein that catalyzes the ester-forming reaction for pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifolium*- a new target for plant protection [J]. Plant J, 71(2): 183-193.

KIRCH HH, SCHLINGENSIEPEN S, KOTCHONI S, et al, 2005. Detailed expression analysis of selected genes of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene superfamily in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 57: 315-332.

LEE DS, KIM BK, KWON SJ, et al., 2009. Arabidopsis GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 379(4): 1038-1042.

LI JW, XU ZZ, ZENG T, et al., 2022a. Overexpression of TcCHS Increases pyrethrin content when using a genotype-independent transformation system in pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) [J]. Plants (Basel), 11(12): 1575.

LI JW, ZENG T, XU ZZ, et al., 2022b. Ribozyme-mediated CRISPR/Cas9 gene editing in pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) hairy roots using a RNA polymerase II-dependent promoter [J]. Plant Methods, 18(1): 32.

LI JJ, HU H, MAO J, et al., 2019. Defense of pyrethrum flowers: repelling herbivores and recruiting carnivores by producing aphid alarm pheromone [J]. New Phytol, 223(3): 1607-1620.

LI JJ, HU H, CHEN Y, et al., 2021. Tissue specificity of (*E*)-β-farnesene and germacrene D accumulation in pyrethrum flowers [J]. Phytochemistry, 187: 112768.

LI W, ZHOU F, PICHERSKY E, 2018. Jasmone hydroxylase, a key enzyme in the synthesis of the alcohol moiety of pyrethrin insecticides [J]. Plant Physiol, 177(4): 1498-1509.

LV ZY, ZHANG L, TANG KX, 2017. New insights into artemisinin regulation [J]. Plant Signal Behav, 12(10): e1366398.

LYBRAND DB, XU HY, LAST RL, et al., 2020. How plants synthesize pyrethrins: safe and biodegradable insecticides [J]. Trends Plant Sci, 25(12): 1240-1251.

MA R, YUAN HL, AN J, et al., 2018. A *Gossypium hirsutum* GDSL lipase/hydrolase gene (*GhGLIP*) appears to be involved in promoting seed growth in *Arabidopsis* [J]. PLoS ONE, 13(4): e0195556.

MATSUDA K, KIKUTA Y, HABA A, et al., 2005. Biosynthesis of pyrethrin I in seedlings of *Chrysanthemum cinerariaefolium* [J]. Phytochemistry, 66(13): 1529-1535.

MOSSA AH, MOHAFRASH SMM, CHANDRASEKARAN N, 2018. Safety of natural insecticides: toxic effects on experimental animals [J]. Biomed Res Int, 2018(1): 1-17.

NELSON RH, 1974. Pyrethrum: The Natural Insecticide [J]. Bull Esa, 20(3): 16.

OH IS, PARK AR, BAE MS, et al., 2005. Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola* [J]. Plant Cell, 17(10): 2832-2847.

RAMIREZ AM, STOOPEN G, MENZEL TR, et al., 2012. Bidirectional secretions from glandular trichomes of pyrethrum enable immunization of seedlings [J]. Plant Cell, 24(10): 4252-4265.

STAUDINGER H, RUZICKA L, 1924. Insektentötende Stoffe IV. Konstitution des Tetrahydro-pyrethrons [J]. Helvetica Chimica Acta, 7(1): 236-244.

SULTANA S, HU H, GAO L, et al., 2015. Molecular cloning and characterization of the trichome specific chrysanthemyl diphosphate/chrysanthemol synthase promoter from *Tanacetum cinerariifolium* [J]. Sci Hort, 185: 193-199.

SURAWEERA DD, GROOM T, TAYLOR PWJ, et al., 2017. Dynamics of flower, achene and trichome development governs the accumulation of pyrethrins in pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium*) under irrigated and dryland conditions [J]. Indust Crops Prod, 109: 123-133.

WANG HY, 2016. Molecular cloning and characterization of the promoter of aldehyde dehydrogenase gene from *Artemisia annua* L. [D]. Chongqing: Southwest University: 43.［王焕燕，2016. 黄花蒿 ALDH1 启动子的克隆及其功能分析 [D]. 重庆: 西南大学.］

WASTERNACK C, STRNAD M, 2019. Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites - Pathways, transcription factors and applied aspects—A brief review [J]. New Biotechnology, 48: 1-11.

WANG Y, WEN J, LIU L, et al., 2022. Engineering of tomato type VI glandular trichomes for trans-chrysanthemic acid biosynthesis, the acid moiety of natural pyrethrin insecticides [J]. Metab Eng, 72: 188-199.

WANG FJ, XU HY, YAN JB, et al., 2021. Biosynthesis and application of pyrethrins: a natural pesticide from plants [J]. Synth Biol J, 2(5): 753-761. ［王凤姣，徐海洋，闫建斌，等，2021. 植物天然农药除虫菊酯的生物合成和应用研究进展 [J]. 合成生物学，2(5): 753-761.］

XU HY, MOGHE GD, WIEGERT-RININGER K, et al., 2018. Coexpression analysis identifies two oxidoreductases involved in the biosynthesis of the monoterpene acid moiety of natural pyrethrin insecticides in *Tanacetum cinerariifolium* [J]. Plant Physiol, 176(1): 524-537.

YAMASHIRO T, SHIRAISHI A, SATAKE H, et al., 2019. Draft genome of *Tanacetum cinerariifolium*, the natural source of mosquito coil [J]. Sci Rep, 9(1): 18249.

YANG Y, YU TF, MA J, et al., 2020. The soybean bZIP transcription factor gene *GmbZIP2* confers drought and salt resistances in transgenic plants [J]. Int J Mol Sci, 21(2): 670.

YANG YN, KIM Y, KIM H, et al., 2021. The transcription factor *ORA59* exhibits dual DNA binding specificity that differentially regulates ethylene- and jasmonic acid-induced genes in plant immunity [J]. Plant Physiol, 187(4): 2763-2784.

ZENG T, LI JW, XU ZZ, et al., 2022. TcMYC2 regulates pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifolium* [J]. Hortic Res, 9: uhac178.

ZENG T, LI JW, ZHOU L, et al., 2021. Transcriptional responses and GCMS analysis for the biosynthesis of pyrethrins and volatile terpenes in *Tanacetum coccineum* [J]. Int J Mol Sci, 22(23): 13005.

ZENG T, LI JW, ZHOU L, et al, 2021. Advances in the mutualistic and antagonistic interactions between flower colors and the pollinators of ornamental plants [J]. Acta Hortic Sin, 48(10): 2001-2017. ［曾拓，李伽文，周黎，等，2021. 观赏植物花色与授粉昆虫相互适应关系的研究进展 [J]. 园艺学报，48(10): 2001-2017.］

ZHOU L, LI JW, ZENG T, et al., 2022. TcMYB8, a R3-MYB transcription factor, positively regulates pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifolium* [J]. Int J Mol Sci, 23(20): 12186.

ZHOU L, ZENG T, LI JJ, et al., 2022. The preliminary investigation on the interplanting patterns and agronomic effects of *Tanacetum cinerariifolium* and horticultural plants [J]. J Guizhou Norm Univ (Nat Sci Ed), 40(3): 18-26. ［周黎，曾拓，李进进，等，2022. 除虫菊间作套种模式及其农艺效应初探 [J]. 贵州师范大学学报(自然科学版)，40(3): 18-26.］